

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

20 April 2000 (20.04.00)

International application No.:

PCT/JP99/05548

Applicant's or agent's file reference:

E4831-00

International filing date:

07 October 1999 (07.10.99)

Priority date:

12 October 1998 (12.10.98)

Applicant:

SAITO, Izumu et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

10 February 2000 (10.02.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(TRANSLATION)

PATENT COOPERATION TREATY  
PCT  
INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference <b>E4831-00</b>	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"><div><b>FOR FURTHER ACTION</b></div><div>see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA220) as well as, what applicable, item 5 below.</div></div>	
International application No. <b>PCT/JP99/05548</b>	International Filing date (day/month/year) <b>07.10.99</b>	(Earliest) Priority Date (day/month/year) <b>12.10.98</b>
Applicant: <p style="text-align: center;"><b>SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED</b></p>		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 2 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless other wise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.

☒ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☒ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box II).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. \_\_\_\_\_

☐ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☒ None of the figures.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05548

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/00, 7/00, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/00, 7/00, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), BIOSIS (DIALOG), WPIDS (STN), DDBJ, EMBL, GeneBank, Genseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 8-84589, A (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY LIMITED), 02 April, 1996 (02.04.96), Claims & EP, 704534, A2 & US, 5817492, A & AU, 9530248, A & CA, 2157063, A	1-15
A	JP, 8-308585, A (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY LIMITED), 26 November, 1996 (26.11.96), Claims & EP, 732405, A1 & US, 5700470, A & AU, 9648031, A & CA, 2171368, A	1-15
A	JP, 10-33175, A (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.), 10 February, 1998 (10.02.98), Claims (Family: none)	1-15
A	SUSAN M. et al., "A modular set of Flp, FRT and lacZ fusion vectors for manipulating genes by site-specific recombination.", gene, Vol. 171, p.197-201 (1996)	16-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
28 December, 1999 (28.12.99)

Date of mailing of the international search report  
11 January, 2000 (11.01.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



EP



PCT

## 国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
[PCT 18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 E 4 8 3 1 - 0 0	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 9 9 / 0 5 5 4 8	国際出願日 (日.月.年) 0 7 . 1 0 . 9 9	優先日 (日.月.年) 1 2 . 1 0 . 9 8
出願人 (氏名又は名称) 住 友 製 薬 株 式 会 社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT 18条) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/00, 7/00, A61K48/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/00, 7/00, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), BIOSIS (DIALOG), WPIDS (STN), DDBJ, EMBL, GeneBank, Genseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 8-84589, A (住友製薬株式会社), 2. 4月. 1996 (02. 04. 96), 特許請求の範囲等参照, & EP, 704534, A2 & US, 5817492, A & AU, 9530248, A & CA, 2157063, A	1-15
A	JP, 8-308585, A (住友製薬株式会社), 26. 11月. 1996 (26. 11. 96), 特許請求の範囲等参照, & EP, 732405, A1 & US, 5700470, A & AU, 9648031, A & CA, 2171368, A	1-15
A	JP, 10-33175, A (久光製薬株式会社), 10. 2月. 1998 (10. 02. 98), 特許請求の範囲等参照, (ファミリーなし)	1-15
A	SUSAN M. et al., "A modular set of F1p, FRT and lacZ fusion vectors for ma nipulating genes by site-specific recombination.", gene, Vol. 171, p. 197-201 (1996)	16-20

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 12. 99

国際調査報告の発送日

11.01.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
 郵便番号 100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
 坂崎 恵美子

4 N 9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

5640  
Vonda  
5/6/01

Applicant's or agent's file reference E4831-00	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/05548	International filing date (day/month/year) 07 October 1999 (07.10.99)	Priority date (day/month/year) 12 October 1998 (12.10.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/00, 7/00, A61K 48/00		
Applicant SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 10 February 2000 (10.02.00)	Date of completion of this report 31 October 2000 (31.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05548

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 99/05548

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

- Document 1: JP, 8-84589, A (Sumitomo Pharmaceutical Co., Ltd.), 2 April 1996 (02.04.96)
- Document 2: JP, 8-308585, A (Sumitomo Pharmaceutical Co., Ltd.), 26 November 1996 (26.11.96)
- Document 3: JP, 10-33175, A (Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.), 10 February 1998 (10.02.98)
- Document 4: Gene (1996), Vol. 171, pp. 197-201

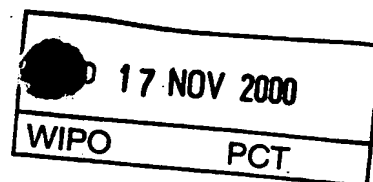
The invention described in Claims 1-15 involves an inventive step relative to Documents 1-4 cited in the international search report.

Documents 1-4 do not indicate that expression of Cre protein can be controlled by inserting a recombinase FLP recognition sequence and stuffer DNA between the promoter sequence and the Cre gene, and a person skilled in the art could not deduce the advantageous effects of this combination from prior art documents.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 E4831-00	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/05548	国際出願日 (日.月.年) 07.10.99	優先日 (日.月.年) 12.10.98
国際特許分類(IPC) Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/00, 7/00, A61K48/00		
出願人(氏名又は名称) 住友製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で            ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - II ☐ 優先権
  - III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - IV ☐ 発明の単一性の欠如
  - V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - VI ☐ ある種の引用文献
  - VII ☐ 国際出願の不備
  - VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 10.02.00	国際予備審査報告を作成した日 31.10.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 引地 進 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 9549

**THIS PAGE BLANK (USE 70)**

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-20	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲	1-20	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-20	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: JP, 8-84589, A (住友製薬株式会社) 2.4月.1996 (02.04.96)  
 文献2: JP, 8-308585, A (住友製薬株式会社) 26.11月.1996 (26.11.96)  
 文献3: JP, 10-33175, A (久光製薬株式会社) 10.2月.1998 (10.02.98)  
 文献4: Gene (1996) Vol. 171 p. 197-201

請求の範囲1-15に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1~4に対して進歩性を有する。

文献1~4には、プロモーターとCre遺伝子との間にリコンビナーゼFLPの認識配列およびスタッファーDNAを挿入すると、Cre蛋白質の発現を制御できることは記載されておらず、この組み合わせによる効果を当業者が先行技術文献から導き出せたとも認められない。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**





PCT

特許条約に基づいて公開された国 願

<p>(51) 国際特許分類7 C12N 15/00, 7/00, A61K 48/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/22106</p> <p>(43) 国際公開日 2000年4月20日(20.04.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05548</p> <p>(22) 国際出願日 1999年10月7日(07.10.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/289785 1998年10月12日(12.10.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED.)[JP/JP] 〒541-8510 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 斎藤 泉(SAITO, Izumu)[JP/JP] 〒151-0053 東京都渋谷区代々木2丁目37番15-412号 Tokyo, (JP)</p> <p>鐘ヶ江裕美(KANEGAE, Yumi)[JP/JP] 〒141-0031 東京都品川区西五反田8丁目10番14-1405号 Tokyo, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 浅村 皓, 外(ASAMURA, Kiyoshi et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: CELLS EXPRESSING RECOMBINASE</p> <p>(54)発明の名称 リコンビナーゼ発現細胞</p> <p>(57) Abstract Cells expressing a recombinase Cre in the presence of a recombinase FLP depending on FLP; a method for expressing the recombinase Cre by transferring the recombinase FLP into the above cells; a process for producing a recombinant virus vector characterized by using the cells expressing the recombinase Cre in the presence of the recombinase FLP depending on FLP; and a process for producing a recombinant adenovirus vector by using the above-described method for expressing Cre and another method for producing the above recombinant virus vector.</p>		

## (57)要約

本発明により、リコンビナーゼF L Pの存在下でF L P依存的にリコンビナーゼC r eを発現する細胞、前記細胞にリコンビナーゼF L Pを導入することによりリコンビナーゼC r eを発現させる方法、リコンビナーゼF L Pの存在下でF L P依存的にリコンビナーゼC r eを発現する細胞を用いることを特徴とする、組換えウイルスベクターの製造方法、ならびに前記C r eを発現させる方法および前記組換えウイルスベクターの製造方法を用いた組換えアデノウイルスベクターの製造方法が提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	HR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HU	ハンガリー		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CH	スイス	IL	イスラエル	MR	モーリタニア	US	米国
CI	コートジボワール	IN	インド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IS	アイスランド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CN	中国	IT	イタリア	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	KE	ケニア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KR	韓国	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		

## 明 細 書

## リコンビナーゼ発現細胞

## 5 技術分野

本発明は、リコンビナーゼ発現細胞およびかかる細胞を用いる組換えウイルスベクターの作製方法に関する。

## 背景技術

- 動物細胞への遺伝子導入用または遺伝子治療用のウイルスベクターとして、レ
- 10 トロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス等が用いられている。これらのウイルスベクターを遺伝子治療に用いる場合、その安全性の観点から、ウイルスにコードされる蛋白質がなるべく発現しない構造のベクターが望まれている。

- レトロウイルスベクターにおいては、ウイルスの増殖に必要なすべての蛋白質
- 15 を供給するウイルス産生細胞が樹立されている。一方、アデノウイルスベクターやヘルペスウイルスベクターでは、ウイルスにコードされる蛋白質の種類の多さおよびその蛋白質の細胞毒性の問題から、ウイルスの複製に必要なすべての蛋白質を供給するウイルス産生細胞は樹立されていない。その代替法として、これらのウイルスベクター作製においては、ヘルパーウイルスを使用する方法が用いら
- 20 れている。その方法は、目的の遺伝子を挿入したベクター側のウイルスは、ウイルスの増殖に必須の遺伝子の一部またはすべてを除いてあるため、ベクター単独では増殖できないが、ヘルパーウイルスからウイルスの増殖に必要なウイルス蛋白質を供給することにより、ヘルパーウイルスとともにベクターも増殖させるというものである。このヘルパーウイルスを用いる方法により、アデノウイルスベ
- 25 クター(Mitani et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.92. 3854-3858 (1995))やヘルペスウイルスベクター(Banerjee et. al., Nature Medicine. Vol.1, 1303-1308 (1995))が作製されている。

ヘルパーウイルスを用いるウイルスベクター作製法での課題の一つは、目的ウイルスベクターに対してヘルパーウイルスの量をいかに減らすかという点である。

そのため、アデノウイルスベクターでは、パッケージング配列の変異株由来のヘルパーウイルスを用いてヘルパーウイルスDNAのウイルス粒子 (virion) へのパッケージング効率を下げ、ヘルパーウイルスの増殖速度を遅くした工夫や (Kochanek et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93. 5731-5736 (1996))、ヘルパーウイルスのパッケージング配列の両側にリコンビナーゼ Cre の認識配列である lox P 配列を挿入し、このヘルパーウイルスをリコンビナーゼ Cre を発現する細胞に感染させることによりパッケージング配列を除く工夫 (Parks et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93. 13565-13570 (1996)) 等がなされている。

特に、後者の方法において、リコンビナーゼ Cre を発現する細胞は重要であり、Cre を恒常的に発現するいくつかの細胞株が報告されている (Parks et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 93. 13565-13570 (1996)、Chen et. al., Somat. Cell Mol. Genet. Vol. 22. 477-488 (1996)、Lieber et. al., J. Virol. Vol.70. 8944-8960 (1996))。しかし、リコンビナーゼ Cre は、動物細胞に対して細胞毒性を有するため、恒常的に Cre を発現する細胞株は樹立できないものの、高発現プロモーターの制御下に Cre を大量に発現する安定な細胞株は樹立しにくいと考えられている (Lieber et. al. J. Virol. Vol.70. 8944-8960 (1996))。

#### 発明の開示

本発明の目的は、種々のウイルスベクターの作製のために用いる、Cre を高発現する細胞を提供することにある。本発明のさらなる目的は、かかる細胞を使用して、より効率的な組換えウイルスベクターの作製方法を提供することにある。

Cre 蛋白質に限らず、細胞毒性を有する蛋白質を恒常的に発現する細胞株を樹立しようとする場合、一般に高発現プロモーター下流に当該蛋白質遺伝子を組み込んだプラスミド等で細胞を形質転換しても、当該蛋白質を高レベルで安定に発現する細胞株は得にくく、当該蛋白質の毒性が細胞にとって許容レベル以下の量の蛋白質を発現する細胞株しか得られないことが多い。

一方、薬剤等により蛋白質の発現を誘導するプロモーターも知られている。しかし、一般にこのような誘導型のプロモーターは、恒常的に発現する強力なプロモーターに較べれば、そのプロモーター活性は弱いことが知られている。

そこで、本発明者らは、強力なプロモーターからC r e 蛋白質を発現する安定な細胞株を得るための手段として、プロモーターとC r e 遺伝子との間にリコンビナーゼF L Pの認識配列およびスタッファーDNAを挿入することにより、C r e 蛋白質の発現を制御することに成功した。この細胞株は、リコンビナーゼF L Pが存在しない場合にはC r e 蛋白質がほとんど発現しないため、C r e の細胞毒性が回避でき、F L P存在下では強力なプロモーターからC r e 蛋白質が高発現する。

すなわち、本発明の要旨は、

- (1) リコンビナーゼF L Pの存在下でF L P依存的にリコンビナーゼC r e を発現する細胞、
- (2) 前記(1)記載の細胞に、リコンビナーゼF L Pを導入することによりリコンビナーゼC r eを発現させる方法、
- (3) リコンビナーゼF L Pの存在下でF L P依存的にリコンビナーゼC r eを発現する細胞を用いることを特徴とする、組換えウイルスベクターの製造方法、
- (4) 前記(2)および前記(3)記載の方法を用いた組換えアデノウイルスベクターの製造方法、

ならびに

- (5) 酵母由来F L Pをコードする塩基配列において、F L P蛋白質のアミノ酸をコードするコドン置換することにより、酵母において好適に用いられるコドンの比率がヒトにおいて好適に用いられるコドンの比率に変更されることによる、ヒトを含む動物細胞でのF L Pタンパク質の翻訳効率が増強された改変塩基配列を有するDNA、
- に関する。

図面の簡単な説明

- 図1は、プラスミドp C A L N L Z (A)、プラスミドp U F N F (B)およびプラスミドp C A L N L 5 (C)の構造を示す模式図である。図中、C A P r oはC A Gプロモーター、N e o<sup>R</sup>はネオマイシン耐性遺伝子、S p AはS V 4 0ポリA配列、G p Aはβ-グロビンポリA配列を示す。斜線を引いた箱内の部分はl o x P配列を、黒塗り部分はF R T配列を示す。A p<sup>R</sup>はアンピ

シリル耐性遺伝子、*ori* はプラスミドの複製起点を示す。X は制限酵素 *Xho I* 部位を、M は制限酵素 *Mlu I* 部位を示す。

図 2 は、プラスミド *pCAFNFNCre* の構造を示す模式図である。  
*NCre* は核移行シグナルを有する *Cre* 遺伝子を示す。

- 5 図 3 は、プラスミド *pxC AFLP* (A)、プラスミド *pxC Aw t* (B) およびプラスミド *pxC ALNLZ* (C) の構造を示す模式図である。太線部は、アデノウイルスゲノム (約 0.4 kb) を示す。

- 図 4 はヒト型 FLP の塩基配列の例を示す。図中左欄の数値は、翻訳開始点の最初の塩基を 1 番とした時の塩基番号を示す。小文字は酵母の配列から置換した塩基を示し、下線部はアミノ酸配列を置換した箇所を示す。
- 10 発明を実施するための最良の形態

- 本発明において、「リコンビナーゼ FLP」とは、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の 2 ミクロン DNA によりコードされ、2 つの FLP の認識配列 (FRT) 間の部位特異的組換え反応を行なう酵素である (Babineau et. al., J. Biol. Chem., Vol. 260, 12313-12319 (1985))。FLP は、2 つの同一方向の FRT に挟まれた DNA を切り出すことが可能である。FRT は 34 bp からなる塩基配列 (Jayaram et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 82, 5875-5879 (1985)) であり、本発明においては、「FLP の認識配列」とは、FRT を含む塩基配列であれば特に限定されない。
- 15

- 20 本発明において、「リコンビナーゼ FLP の存在下で FLP 依存的にリコンビナーゼ Cre を発現する」とは、リコンビナーゼ FLP の非存在下ではリコンビナーゼ Cre が発現できないように構築された DNA をゲノム中に有する細胞が、リコンビナーゼ FLP の存在下では、2 つの同一方向の FRT に挟まれた DNA を切り出すことにより、リコンビナーゼ Cre の発現を開始することをいう。

- 25 本発明において「リコンビナーゼ Cre」とは、大腸菌のバクテリオファージ P1 がコードし、バクテリオファージ P1 内の *lox P* 配列 (Abremski ら, J. Biol. Chem. 1509-1514 (1984) ; および Hoess ら, Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 81, 1026-1029 (1984)) を基質とする、特異的な DNA 組換え酵素であり、*lox P* 配列を認識し、この配列間で DNA の切断、鎖の交換と結合の全工程を

行なう。即ち、 $l o x P$ 配列がリコンビナーゼ $C r e$ の認識配列となる。

リコンビナーゼ $C r e$ 遺伝子は、バクテリオファージ $P 1$ のDNAのリコンビナーゼ遺伝子をコードする部分を、例えば、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション (PCR) 法を用いて増幅してプラスミドにクローニングしたもの (例えば、  
5  $p U C C r e$  (特開平8-84589号公報)) から適当な制限酵素により切り出して使用することができる。

本発明においては、リコンビナーゼ $C r e$ 遺伝子配列の5'側または3'側の末端に核移行シグナル配列を接続させていることが好ましい。これは、細胞質で合成されたリコンビナーゼ $C r e$ がその認識配列である $l o x P$ 配列を有するD  
10 NAに効果的に作用するには、核内に移行する必要がある、核移行シグナル配列はこれを促進する (Daniel Kalderon ら、Cell. 39、499-509 (1984)) からである。核移行シグナル配列を有する $C r e$ 遺伝子は、プラスミド $p S R N C r e$  (Kanegae Y. et. al., Nucleic Acid Res., Vol. 23, 3816-3821 (1995)) 等から得ることができる。

15 本発明の細胞のゲノムに存在する前記構築DNAは、具体的には、プロモーター、リコンビナーゼ $F L P$ の認識配列、スタッパー配列、リコンビナーゼ $F L P$ の認識配列、リコンビナーゼ $C r e$ 遺伝子配列を上流からこの順に含む。

前記プロモーターとしては、哺乳動物細胞で機能する限り特に限定されないが、その例として、 $S R \alpha$ プロモーター (Molecular and Cellular Biology, Vol. 8,  
20 466-472 (1991))、 $E F - 1 \alpha$ プロモーター (Gene, Vol. 91, 217-223 (1990))、 $CMV$ プロモーター等が挙げられる。

しかし本発明には、 $C A G$ プロモーターが特に有利に用いられる。このプロモーターは、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリ $\beta$ -アクチンプロモーター、ウサギ $\beta$ グロビンのスプライシングアクセプターおよびポリA配列からなるハイブリッドプロモーター ( $C A G$ プロモーター) であり、高発現ベクターとして  
25 特開平3-168087号公報に開示されている。その調製は同公報に記載されている $p C A G G S$  (特開平3-168087号公報、13頁20行~20頁14行および22頁1行~25頁6行) から制限酵素 $S a l I$ 、 $H i n d III$ で切り出すことにより行なうことができ、本発明に利用することができる。また、

市販のプラスミドから適当な制限酵素で切り出して用いることもできる。

リコンビナーゼ F L P の認識配列とは、前記したように、F R T を含む塩基配列であれば特に限定されない。当該配列は、DNA 合成装置により合成して用いることができる。

- 5 前記スタッパー配列とは、2つの同一方向のリコンビナーゼ F L P の認識配列に挟まれた塩基配列をいい、F L P の存在下では環状に切り出される配列である。

- スタッパー配列は、C r e 遺伝子の発現を阻止する配列であれば特に制限はないが、細胞をトランスフェクションして目的の DNA が組み込まれたかどうかを確認することができるように、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子を含有することが好ましく、哺乳動物細胞の選択に好適に用いられるネオマイシン耐性遺伝子がより好ましい。また、スタッパー配列は、薬剤耐性遺伝子を効率的に発現させ、下流に位置するリコンビナーゼ C r e 遺伝子が発現しないように、薬剤耐性遺伝子の下流にポリ A 配列をも含むことがさらに好ましい。ポリ A 配列として
- 10 は、特に限定されるものではないが、S V 4 0 由来のポリ A 配列、ウサギ  $\beta$  グロビンのポリ A 配列等が挙げられる。これらの薬剤耐性遺伝子およびポリ A 配列は、市販のプラスミドから入手可能である。

リコンビナーゼ C r e 遺伝子の下流に用いられるポリ A 配列としては、特に限定されるものでないが、ウサギ  $\beta$  グロビン由来のものが好ましい。

- 20 本発明の細胞を調製するために用いる細胞としては、目的のウイルスベクターの増殖に適した細胞であれば特に限定されない。

- 本発明の細胞をアデノウイルスベクター作製に用いる場合は、アデノウイルス E 1 A 遺伝子を発現する細胞を用いることが望ましい。E 1 A 遺伝子を発現する細胞は、既存の方法 (Imler et. al. Gene Ther. Vol. 3. 75-84 (1996)) 等により作製できるが、E 1 A 遺伝子を持続的に発現しているヒト胎児腎由来細胞株 2
- 25 9 3 細胞 (A T C C C R L 1 5 7 3) がより好ましい。しかしながら、当該細胞が E 1 A 遺伝子のみを発現している必要はなく、他のアデノウイルス遺伝子やその他の遺伝子が発現していてもよい。

以下、2 9 3 細胞を用いて、リコンビナーゼ F L P の存在下で F L P 依存的に



リコンビナーゼ Cre を発現する細胞の調製方法の一例を説明する。

〔1〕 34bp の FRT 配列を含有し、制限酵素 Sma I 部位を導入するために合成された 54bp の DNA (配列番号: 1) を同じ方向に 2 個含み、かつ、2 個の FRT 配列間に Sma I 部位を有するプラスミドを構築する。以下、本発明においては、Sma I 部位を導入したプラスミド等が好適に用いられる。

〔2〕 プラスミド pCALNLZ (Y. Kanegae et. al., Gene, Vol. 181, 207-212 (1996)、図 1A) からネオマイシン耐性遺伝子と SV40 のポリ A 配列を含む断片を調製し、前記〔1〕で得られたプラスミドの Sma I 部位に挿入して、当該断片の両端に FRT 配列を有するプラスミド pUFNF (図 1B) を得る。

〔3〕 CAG プロモーターおよびウサギ  $\beta$ -グロビンポリ A 配列の供給源であるプラスミド pCALNLw (Kanegae Y. et. al., Gene, Vol. 181, 207-212 (1996)) の Sma I 部位に 27 塩基の合成ポリリンカー (配列番号: 2) を挿入し、プラスミド pCALNL5 (図 1C) を得る。前記〔2〕で得られた pUFNF から FRT 配列/ネオマイシン耐性遺伝子/SV40 のポリ A 配列/FRT 配列を含む断片を調製し、前記 pCALNL5 由来の CAG プロモーターを含む断片と連結し、プラスミド pCAFNF5 を得る。このプラスミドは、pCALNL5 の 2 つの loxP 配列それぞれが FRT 配列に置換された構造を有する。

〔4〕 プラスミド pSRNCre (Kanegae Y. et. al., Nucleic Acid Res., Vol. 23, 3816-3821 (1995)) から核移行シグナルを付加した Cre 遺伝子 (NCr) を含む断片を調製し、前記〔3〕で得られた pCAFNF5 の Sma I 部位に挿入し、プラスミド pCAFNFNCr (図 2) を得る。

〔5〕 293 細胞に前記〔4〕で得られた pCAFNFNCr をトランスフェクション (リン酸カルシウム共沈法) 後、G418 (ネオマイシン誘導体) 耐性細胞をシングルクローン化し、本発明の細胞 (293FNCr 細胞) を得る。

このようにして得られた 293FNCr 細胞等の本発明の細胞は、当該細胞にリコンビナーゼ FLP 遺伝子または FLP 蛋白質を導入することにより、リコンビナーゼ Cre を高発現することができる。リコンビナーゼ FLP 遺伝子の導

入方法としては、プラスミドを直接またはトランスフェクションにより導入する方法、ウイルスベクターを用いる方法、リポソーム法などが挙げられる。293 FNCr e細胞等のアデノウイルスの増殖に適した細胞の場合は、FLP遺伝子はアデノウイルスベクターを用いて導入するのがより好ましい。

- 5     293 FNCr e細胞等の本発明の細胞は、ヘルパーウイルスを用いるウイルスベクターの作製に利用できる。293 FNCr e細胞を用いた組換えアデノウイルスベクターの作製を例として、以下にその具体的な方法を示す。

- アデノウイルスの逆方向反復配列 (inverted terminal repeat: ITR) とパッケージング配列のみを有し、他のすべてのアデノウイルスゲノムが外来遺伝子に置換された組換えアデノウイルスベクター (目的ウイルス) は、それ単独では増殖することができないため、ヘルパーウイルスの共存下に増殖させる。その際、ヘルパーウイルスの増殖を抑制するため、ヘルパーウイルスのパッケージング配列の両端に lox P 配列を挿入しておき、このヘルパーウイルスと目的ウイルスまたは目的ウイルスのDNAを含むプラスミドとをCre発現293細胞に感染またはトランスフェクションすることにより、ヘルパーウイルスのパッケージング配列を欠失させ、その増殖を抑制し、目的ウイルスの割合を高める試みがなされている (Parks et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93. 13565-13570 (1996))。この場合、Creの発現量が高いほど効率的にヘルパーウイルスのパッケージング配列が除かれ、目的ウイルスの割合が高くなると考えられる。

- 20     本発明の293 FNCr e細胞は、FLP発現組換えアデノウイルスと共に用いることにより、Cre発現293細胞を代替でき、恒常的にCreを発現する293細胞よりも大量のCreを発現することができる。したがって、Cre発現293細胞よりも効率的にヘルパーウイルスのパッケージング配列を除くことができ、目的ウイルスの割合を高めることができる。その際、FLP発現アデノ
- 25     ウイルス自体のパッケージング配列の両端に lox P 配列を挿入しておけば、このアデノウイルスはFLPを供給するだけでなく、ヘルパーウイルスとして作用させることができる。

本発明の293 FNCr e細胞等の細胞は、組換えアデノウイルスベクター作製だけでなく、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの作製にも用いることが

できる。以下に293FNCr e細胞を用いたAAVベクター作製の例を挙げる。

AAVベクターの作製には、AAVのベクタープラスミドと共に、ヘルパーウイルスとしてアデノウイルスを293細胞等の細胞に感染させる必要がある (Berns et. al., Adv. Virus. Res., Vol. 32, 243-306 (1987))。ヘルパーウイルスとして用いたアデノウイルスは、AAVベクター生成後に、熱失活等の操作によりAAVベクターから除く必要があるため、ヘルパーウイルス自体は増殖しない方が望ましい。

本発明の293FNCr e細胞をAAV産生細胞として、パッケージング配列の両端に10xP配列を挿入したFLP発現アデノウイルスをヘルパーウイルスとして用いることにより、ヘルパーウイルスはAAVの増殖に必要な蛋白質を供給するがそれ自体は感染粒子にパッケージングされないため、効率的にAAVベクターを製造することができる。

さらに、本発明の細胞は、ヘルパーウイルスを用いる他のウイルスベクター作製にも応用できる。その例として、ヘルペスウイルスベクターが挙げられる。ヘルペスウイルスの増殖に適した細胞を、293FNCr e細胞と同様な方法で形質転換し、FLP依存的にCr eを発現するようにしておく一方、ヘルパーウイルスは、パッケージング配列の両端に10xP配列を挿入しておく。目的遺伝子を有するベクタープラスミドをFLP依存的にCr eを発現する細胞にトランスフェクションし、ヘルパーウイルスを感染させ、何らかの方法で細胞にFLPを発現させることにより、ヘルパーウイルスはパッケージング配列が除かれるため増殖せず、目的のベクターウイルスのみが得られる。細胞にFLP蛋白質を発現させる例として、ヘルパーウイルスにFLPの発現単位を挿入しておく方法が挙げられる。

また、リコンビナーゼFLPは、Cr eと同様のDNA組換え反応を行う酵素であるが、ヒトを含む細胞由来細胞にFLP遺伝子を導入しても、動物細胞の培養を行う通常の温度 (37℃) では、FLP蛋白質が十分には産生されていない可能性が示されている。中野らの報告では、高発現プロモーターである前述のCAGプロモーター下流に連結したFLP遺伝子を、高発現ベクターであるアデノウイルスベクターに挿入し、当該ベクターを培養動物細胞に感染させても、FLP蛋白質

白質が十分には産生されない可能性が示された（平成11年度日本癌学会発表演題番号2463）。FLP遺伝子の発現に用いたプロモーターは、高発現プロモーターであるCAGプロモーターであることより、FLP蛋白質が十分には産生されない原因は、転写段階ではなく翻訳段階が律速になっていることが推測される。FLP遺伝子を動物培養細胞に導入することにより発現したFLP蛋白質を十分に機能させるためには、動物細胞でのFLP蛋白質の発現量を増加させることが必須である。

そこで、本発明者らは、酵母由来の蛋白質であるFLPのコドン、酵母で好適に用いられるコドンの比率から、ヒトにおいて好適に用いられるコドンの比率に変更することにより、ヒトを含む動物細胞でのFLP蛋白質の翻訳効率を増強させることを考案した。すなわち、酵母由来FLPをコードする塩基配列において、FLP蛋白質のアミノ酸をコードするコドンを置換することにより、酵母において好適に用いられるコドンの比率がヒトにおいて好適に用いられるコドンの比率に変更されることによる、ヒトを含む動物細胞でのFLPタンパク質の翻訳効率が増強された改変塩基配列を有するDNAを見出した。

本発明において、「酵母において好適に用いられるコドンの比率」とは、各アミノ酸をコードする複数のコドンのうち、酵母の遺伝子における各コドンの使用頻度のことを示し、その値は既存の文献（Wada K. et. al., Nucleic Acids Res., Vol. 18, Suppl. 2367-2411 (1990)）などに開示されている。その具体例を表1に示す。表1の「酵母遺伝子標準値」は、上記文献に記載された酵母（*S. cerevisiae*）の遺伝子における各コドンの使用頻度をアミノ酸ごとに表示したものである。同様に、「ヒトにおいて好適に用いられるコドンの比率」とは、ヒト遺伝子での各コドンの使用頻度のことを示し、その具体的な値を表1の「ヒト遺伝子標準値」に示す。

本明細書において、「酵母において好適に用いられるコドンの比率」のことを単に「酵母型コドン」、「ヒトにおいて好適に用いられるコドンの比率」のことを単に「ヒト型コドン」と称する場合がある。

本発明において、「酵母において好適に用いられるコドンの比率がヒトにおいて好適に用いられるコドンの比率に変更される」とは、ある蛋白質のアミノ酸配

列を変化させずに、その使用コドンを置換することにより、各コドンの使用頻度を表1の「ヒト遺伝子標準値」に近づけることである。「ヒト遺伝子標準値」に近づける割合に特に制限はなく、ヒト型コドンへの置換によりヒトを含む動物細胞でのF L P蛋白質の翻訳効率が増強するという特徴を満たせば良い。

- 5 本発明において、「ヒト型コドン」に置換したF L Pの塩基配列の例（配列番号：5）を図4ならびに表1に示す。表1ならびに本明細書中で「酵母型F L P」とは酵母由来の本来の塩基配列を有するFLPを示し、「ヒト型F L P」とは、その塩基配列を「ヒト型コドン」に置換した塩基配列を有するF L Pのことを示す。表1に示した「酵母型F L P」と「ヒト型F L P」とを例として、「酵母型
- 10 コドン」から「ヒト型コドン」への置換について、さらに詳細に説明する。

- 例えば、システインには「T G T」と「T G C」の2種類のコドンが使用され、表1において、F L Pには5個のシステインが存在し、酵母型F L Pでは全て「T G T」のコドンが用いられている。この5個の「T G T」のコドンのうち3個を「T G C」のコドンに置換することにより、「T G T」コドンの割合は40%
- 15 となり「ヒト遺伝子標準値」にほぼ等しくなる。この様にして、F L P蛋白質全体のアミノ酸のコドンを「ヒト遺伝子標準値」にできるだけ近づけることが、本発明の「ヒト型コドン」への置換である。

- ただし、機械的に「ヒト遺伝子標準値」に近づけるようにコドンを置換するのではなく、例えば、同一アミノ酸が連続する場合には同一コドンを用いずに、2
- 20 番目以降のアミノ酸のコドンを変え同一コドンが連続しないようにするなどの工夫も本発明に含まれる。

- 本発明の「ヒト型コドン」に置換したF L Pは、さらにその5'末端をKozak配列に一致させるのが好ましい。Kozak配列とは、脊椎動物の遺伝子の翻訳開始点の前後に高頻度に認められる塩基配列のことであり、その詳細は既存の文献に開
- 25 示されている（Kozak M., Nucleic Acids Res., Vol.9, 5233-5262 (1981)、Kozak M., J. Cell Biol., Vol. 108, 229-241 (1989)など）。

本発明の「ヒト型コドン」に置換したFLPは、さらに37℃での酵素活性を増加させるためのアミノ酸の置換を含んでも良い。F L Pの酵素活性の至適温度は30℃であり、動物細胞の培養を行う通常の温度（37℃）では、酵素活性が低下

することが知られている (Buchholz F. et. al., *ucleic Acids Res.* Vol. 24, 4256-4262 (1996))。 F L P 蛋白質の37℃での酵素活性を増加させるための工夫としては、F L P 蛋白質の4つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換することにより、その活性を増加させたとの報告がなされている (Buchholz F, et. al., *Nat. Biotechnol.* Vol.16, 657-662 (1998))。より具体的には、F L P のアミノ酸配列の2番目がプロリンからセリンへ、33番目がロイシンからセリンへ、108番目がチロシンからアスパラギンへ、294番目がセリンからプロリンへ置換されている。表1ならびに図4に示した、本発明におけるヒト型F L P の例はこれら4アミノ酸の置換を含む。

- 10 次に、本発明のヒト型コドンに置換した塩基配列のF L Pを含むDNAの調整法について、図4に示した塩基配列を有するヒト型F L Pを例として述べる。図4の塩基配列に対応する30~40塩基からなるDNAのセンス鎖及びアンチセンス鎖を合成する。その際、両鎖が重なるような配列のDNAとしておく。また、プラスミドにクローニングするため、5'末端側にPst I サイト、3'末端側にKpn
- 15 I サイトを付加しておく。ヒト型F L P 遺伝子には、EcoRVならびにHindIII サイトが各一ヶ所存在するので、Pst I -EcoRV断片、EcoRV-HindIII断片、HindIII-Kpn I断片に相当するDNAを各々アニーリング後別々のプラスミドにクローニングし、次いでこれらの断片を連結しF L P 全長を含むプラスミドを構築する。

- このようにして調製したヒト型F L P 遺伝子を含むDNAは、動物細胞で発現
- 20 可能な適当なプロモーター下流に連結後、プラスミドDNAの形でヒトもしくは動物細胞に遺伝子導入しても良いし、ウイルスベクター、好ましくはアデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入しても良い。

- ヒトもしくは動物細胞に遺伝子導入したF L P 蛋白質の発現量の増加を確認する方法は、特に制限はなく、F L P 蛋白質そのものの量を測定する方法、F L P
- 25 蛋白質の機能を測定する方法などが挙げられる。F L P 蛋白質そのものの量を測定する方法としては、抗F L P 抗体を用いたウエスタンブロット法などが挙げられる。F L P 蛋白質の機能を測定する方法としては、F L P 蛋白質を含む細胞破碎液を酵素溶液として用いてF R T 配列を含む基質DNAの組換え効率を測定する方法や、細胞にF L P 遺伝子とともに基質DNAを同時に導入し、基質DNA

が組換えを起こすことにより細胞に何らかの性質が現れるような測定方法を用いてもよい。後者の例として、プロモーター／F R T配列／ネオマイシン耐性遺伝子／ポリ A配列／F R T配列／l a c Z 遺伝子／ポリ A配列の構造を有する基質 DNAを用い、l a c Z 遺伝子産物である  $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性を測定する

5 方法が挙げられる。

表 1

AA	コドン	酵母型FLP		酵母遺伝子 標準値 (%)	ヒト型FLP		ヒト遺伝子 標準値 (%)
		コドン数	%		コドン数	%	
End	TAA	1	100.0	52.4	0	0.0	29.2
	TAG	0	0.0	19.0	0	0.0	20.8
	TGA	0	0.0	28.6	1	100.0	50.0
Ala	GCT	8	33.3	44.1	4	16.7	28.0
	GCC	4	16.7	24.1	15	62.5	41.6
	GCG	1	4.2	7.9	0	0.0	10.3
	GCA	11	45.8	23.8	5	20.8	20.0
Cys	TGT	5	100.0	67.3	2	40.0	40.6
	TGC	0	0.0	32.7	3	60.0	59.4
Asp	GAT	13	92.9	62.4	9	64.3	42.8
	GAC	1	7.1	37.6	5	35.7	57.2
Glu	GAG	11	42.3	25.7	24	92.3	60.7
	GAA	15	57.7	74.3	2	7.7	39.3
Phe	TTC	9	42.9	46.3	14	66.7	58.9
	TTT	12	57.1	53.7	7	33.3	41.1
Gly	GGC	3	17.6	15.4	12	70.6	35.8
	GGA	8	47.1	15.4	3	17.6	24.1
	GGG	1	5.9	8.8	1	5.9	24.4
	GGT	5	29.4	60.4	1	5.9	15.8
His	CAC	4	44.4	40.0	9	100.0	60.4
	CAT	5	55.6	60.0	0	0.0	39.6
Ile	ATC	9	25.0	29.5	24	66.7	54.0
	ATA	17	47.2	20.5	0	0.0	12.9
	ATT	10	27.8	49.9	12	33.3	33.1
Lys	AAA	22	61.1	51.7	6	16.7	38.9
	AAG	14	38.9	48.3	30	83.3	61.1
Leu	CTT	6	15.4	10.6	0	0.0	11.2
	CTA	9	23.1	13.1	0	0.0	6.5
	CTG	3	7.7	9.2	30	78.9	44.5
	TTG	8	20.5	35.5	4	10.5	11.5
	TTA	11	28.2	27.1	0	0.0	5.5
	CTC	2	5.1	4.5	4	10.5	20.8
Met	ATG	7	100.0	100.0	7	100.0	100.0
Asn	AAC	3	13.6	45.1	17	73.9	57.7
	AAT	19	86.4	54.9	6	26.1	42.3
Pro	CCC	1	6.7	13.3	5	33.3	35.3
	CCT	6	40.0	29.0	5	33.3	27.3
	CCA	7	46.7	48.4	5	33.3	25.7
	CCG	1	6.7	9.3	0	0.0	11.6
Gln	CAG	9	52.9	25.9	16	94.1	75.2
	CAA	8	47.1	74.1	1	5.9	24.8
Arg	CGT	2	10.0	16.9	0	0.0	8.9
	AGA	7	35.0	54.1	4	20.0	18.8
	CGC	1	5.0	4.5	3	15.0	21.4
	CGA	2	10.0	5.2	0	0.0	10.2
	AGG	7	35.0	16.9	10	50.0	21.0
	CGG	1	5.0	2.5	3	15.0	19.7
Ser	TCA	12	29.3	19.5	0	0.0	12.8
	TCC	1	2.4	18.0	16	38.1	24.4
	TCG	5	12.2	8.1	0	0.0	5.8
	TCT	6	14.6	30.8	10	23.8	18.2
	AGC	10	24.4	8.9	13	31.0	25.8
	AGT	7	17.1	14.6	3	7.1	13.0
Thr	ACG	3	10.7	11.5	0	0.0	11.8
	ACC	3	10.7	23.9	17	60.7	40.5
	ACT	9	32.1	37.8	4	14.3	22.4
	ACA	13	46.4	26.8	7	25.0	25.4
Val	GTC	4	21.1	24.4	1	5.3	25.7
	GTG	5	26.3	15.6	17	89.5	48.7
	GTT	5	26.3	43.6	1	5.3	16.4
	GTA	5	26.3	16.4	0	0.0	9.3
Trp	TGG	6	100.0	100.0	6	100.0	100.0
Tyr	TAC	11	52.4	49.8	17	85.0	60.1
	TAT	10	47.6	50.2	3	15.0	39.9



以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではなく、本発明の技術分野における通常の変更ができることは言うまでもない。なお、実施例中のファージ、プラスミド、DNA、各種酵素、大腸菌、培養細胞等を取り扱う諸操作は、特に断らない限り、

- 5 「Molecular Cloning, A Laboratory Manual, T. Maniatis ら編、第2版(1989), Cold Spring Harbor Laboratory」に記載の方法に準じて行なった。

本実施例で用いたコスミドベクター pAxCAwt (Kanegae Y. et. al., Nucleic acid Res., Vol.23, 3816-3821 (1995)) および pAxcw (特開平8-308585号公報、15頁、pAdexlcwはpAxcwと同一である)

- 10 は、アデノウイルスE1およびE3遺伝子以外のアデノウイルス5型ゲノムの大部分を含むベクターである。また、pAxCAwtは、E1遺伝子欠失部位にCAGプロモーターが導入され、かつプロモーターとポリA配列との間にクローニング部位が存在する。pAxcwは、E1遺伝子欠失部位にClaIおよびSwal部位のみが挿入されている。

#### 15 実施例1

FLP蛋白質依存的にリコンビナーゼCreを発現する細胞株(293FNCRe細胞)の作製

- 動物細胞の染色体上に、CAGプロモーター/FRT配列/ネオマイシン耐性遺伝子/SV40ポリA配列/FRT配列/核移行シグナル付きCre遺伝子/  
20  $\beta$ -グロビンポリA配列の構造を有するDNAが挿入された細胞株を得るために、以下の操作を行なった。

- 34bpのFRT配列を含む54塩基の合成DNA(配列番号:1)およびその相補鎖をプラスミドpUC18のSmaI部位に挿入し、FRT配列が同方向に2個挿入され、かつ2個のFRT配列間にSwal部位を有するプラスミドp  
25 UFwF(2.8kb)を得た。

プラスミドpCALNLZ(Y. Kanegae et. al., Gene, Vol.181, 207-212 (1996)、図1A))をMluIおよびXhoIで消化後平滑化したネオマイシン耐性遺伝子とSV40のポリA配列を含む断片を、pUFwFのSwal部位に挿入したプラスミドpUFNF(図1B)を得た。

プラスミド p C A L N L w (Kanegae Y. et. al., Gene, Vol. 181, 207-212 (1996)) の S w a I 部位に 27 塩基の合成ポリリンカー (5'-AAA TTG AAT TCG AGC TCG GTA CCC GGG-3'、配列番号: 2) およびその相補鎖を挿入し、プラスミド p C A L N L 5 (図 1 C) を得た。p U F N F を B a m H I および A s p 7 1 8  
 5 で消化し平滑化した F R T 配列/ネオマイシン耐性遺伝子/S V 4 0 のポリ A 配列/F R T 配列を含む約 1.2 kb の断片を、p C A L N L 5 を M l u I および X h o I で消化後平滑化した C A G プロモーターを含む約 4.9 kb の断片と連結し、プラスミド p C A F N F 5 (6.1 kb) を得た。

プラスミド p S R N C r e (Kanegae Y. et. al., Nucleic Acid Res., Vol. 23, 3816-3821 (1995)) を P s t I および X b a I で消化後平滑化した核移行シグナルを付加した C r e 遺伝子 (N C r e) を含む 1.2 kb の断片を、p C A F N F 5 の S w a I 部位に挿入し、プラスミド p C A F N F N C r e (図 2) を得た。

293 細胞を p C A F N F N C r e で形質転換 (リン酸カルシウム共沈法) 後、G 4 1 8 (ネオマイシン誘導体) 耐性細胞をシングルクローン化し、複数の細胞  
 15 株 (293 F N C r e 細胞) を得た。

## 実施例 2

### リコンビナーゼ F L P 発現プラスミドおよび組換えアデノウイルスの作製

リコンビナーゼ F L P の翻訳開始コドンの前後の塩基配列を K o z a k 配列に合わせたプラスミドを得るため、以下の操作を行った。

20 (a) プラスミド p U C F L P は、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の 2 ミクロン DNA (6318 bp : James et al., Nature, Vol. 286, 860-865 (1980)) の S p h I 部位 (5568 番目) から X b a I 部位 (703 番目) までの F L P 遺伝子全長を含む断片 (1457 bp) が、プラスミド p U C 19 の S p h I - X b a I 部位間に挿入されたプラスミドである。p U C F L P を X b a I および  
 25 S p h I で消化し、F L P 遺伝子全長を含む約 1.5 kb の断片を得た。

(b) 5' 末端突出側が H i n d III 切断部位と、もう一方の末端が S p h I 切断部位と結合可能で、かつ翻訳開始コドンの上流に P s t I 部位を有する以下の配列の合成 DNA アダプターを調製した。

5' -AG CTT CTG CAG CAG ACC GTG CAT CAT G-3' (配列番号 : 3)

3' -A GAC GTC GTC TGG CAC GTA-5' (配列番号 : 4)

(a) および (b) の両DNAをpUC19のHind III-Xba I部位間に挿入し、プラスミドpUKFLP (4.1 kb) を得た。

- 5 pUKFLPをPst IおよびFsp Iで消化後平滑化したFLPコード領域を含む1.4 kbの断片を、コスミドベクターpAxCAwtのプロモーターとポリA配列との間のSwa I部位に挿入し、コスミドベクターpAxCAFLPを得た。

- 前記pAxCAFLPをSal I消化後、自己ライゲーションさせ、アデノウイルスDNAの大部分を除いた (左端約0.4 kbを含む) FLP発現プラスミドpAxCAFLP (図3A) を得た。また同様に、pAxCAwtをSal I消化後自己ライゲーションさせたプラスミドpAxCAwt (図3B) も作製した。pAxCAwtは、実施例3においてpAxCAFLPの陰性対照プラスミドとして用いる。

- 15 pAxCAFLPとアデノウイルスDNA-末端蛋白質複合体とを既知の方法 (Miyake et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.93, 1320-1324 (1996) および特開平7-298877号公報) に従いリン酸カルシウム共沈法で293細胞を形質転換し、目的のFLP発現組換えアデノウイルスAxCAFLP (E1およびE3遺伝子欠失) を得た。

## 20 実施例3

### 293FNCr e細胞のFLP蛋白質に依存したCr e蛋白質の発現確認

- (1) Cr e蛋白質に依存してlacZ遺伝子を発現するプラスミドの作製  
コスミドベクターpAxCALNLZ (Kanegae et. al., Nucleic Acid Res., Vol.23, 3816-3821 (1995)) は、コスミドベクターpAxcwのE1遺伝子欠失  
25 部位に、CAGプロモーター/lacZ配列/ネオマイシン耐性遺伝子/SV40ポリA配列/lacZ配列/大腸菌lacZ遺伝子/β-グロビンのポリA配列が挿入されたコスミドである。pAxCALNLZをSal I消化後自己ライゲーションさせ、アデノウイルスDNAの大部分を除いた (左端約0.4 kbを含む) プラスミドpAxCALNLZ (図3C) を作製した。pAxCALNLZは、

C r e 蛋白質に依存して l a c Z 遺伝子を発現するベクターである。

- (2) 293 F N C r e 細胞の F L P 蛋白質に依存した C r e 蛋白質の発現
- 293 F N C r e 細胞が F L P 蛋白質依存的に C r e 蛋白質を発現することの  
5 確認は、実施例2で作製したプラスミド p x C A F L P とプラスミド p x C A L  
N L Z とのコ・トランスフェクション法により行なった。その原理は、p x C A  
F L P により発現した F L P 蛋白質が 293 F N C r e 細胞の染色体に作用し、  
2 個の F R T 配列間のスタッパー配列（ネオマイシン耐性遺伝子および S V 4  
0 ポリ A 配列）を切り出し、C A G プロモーターから C r e 蛋白質が発現する。  
発現した C r e 蛋白質が、プラスミド p x C A L N L Z の 2 個の l o x P 配列間  
10 のスタッパー配列（ネオマイシン耐性遺伝子および S V 4 0 ポリ A 配列）を切  
り出すことにより、l a c Z 遺伝子が発現する。したがって、これらの 2 つのプ  
ラスミドをコ・トランスフェクションした細胞が l a c Z 遺伝子を発現すれば、  
293 F N C r e 細胞が F L P 蛋白質依存的に C r e 蛋白質を発現することの証  
明となる。以下に、実験方法の詳細および結果を示す。
- 15 実施例1で得た 293 F N C r e 細胞のクローンのうちの 6 クローン（# 1、  
# 2、# 3、# 6、# 8 および # 9）を 6 穴プレートで培養し、0. 5  $\mu$  g の p  
x C A F L P と 0. 5  $\mu$  g の p x C A L N L Z とをリン酸カルシウム共沈法にて  
コ・トランスフェクションした。陰性対照として、p x C A F L P の代わりに実  
施例2で作製した p x C A w t を用いた。
- 20 3 日後、培養液を除き、P B S（-）で細胞面を洗浄後、0. 25% グルタル  
アルデヒド液を加え、4℃で 10 分間細胞を固定後、再度 P B S（-）で洗浄し  
た。発現した  $\beta$ -ガラクトシダーゼを同定するため、X-G a l 染色液（5 mM  
フェリシアン化カリウム / 5 mM フェロシアン化カリウム / 2 mM 塩化マグネシ  
ウム / 1 mg/ml X-G a l（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D  
25 -ガラクトシド） / P B S（-））を加えて 5 時間染色した。

以上の実験の結果、# 1、# 3、# 6 および # 9 の 4 クローンは、p x C A w t と p x C A L N L Z とをコ・トランスフェクションした場合は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現し、青く染色された細胞は数%以下であったが、p x C A F L P と p x C A L N L Z とをコ・トランスフェクションすると、約 50% の細胞が青

く染色された。したがって、これらの4クローンは、プロモーターとC r e 遺伝子との間に、－F R T 配列／ネオマイシン耐性遺伝子／S V 4 0 ポリ A 配列／F R T 配列－が正確に挿入され、F L P 蛋白質依存的にC r e 蛋白質を高発現することが証明された。

#### 5 産業上の利用の可能性

本発明により、組換えウイルスベクター、特に、組換えアデノウイルスベクターの製造に有用な細胞が提供される。本発明により、組換えウイルスベクターの製造が効率的に行なわれ、遺伝子治療の分野で利用可能な組換えウイルスベクターの供給が容易になる。

#### 10 配列表フリーテキスト

配列番号：1の塩基配列は、F L P の認識配列である。

配列番号：2の塩基配列は、ポリリンカーである。

配列番号：3の塩基配列は、アダプターのセンス鎖である。

配列番号：4の塩基配列は、アダプターのアンチセンス鎖である。

#### 15 配列番号：5の塩基配列は、ヒト型F L P 全配列である。

## 請求の範囲

1. リコンビナーゼF L Pの存在下でF L P依存的にリコンビナーゼC r eを発現する細胞。
- 5 2. アデノウイルスE 1 A遺伝子を発現する請求項1記載の細胞。
3. ヒト胎児腎細胞株2 9 3細胞由来である請求項1または2記載の細胞。
4. プロモーター、リコンビナーゼF L Pの認識配列、スタッパー配列、リコンビナーゼF L Pの認識配列、リコンビナーゼC r e遺伝子配列を上流からこの順にゲノム中に有する請求項1～3いずれか記載の細胞。
- 10 5. プロモーターが、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリ $\beta$ -アクチンプロモーター、ウサギ $\beta$ グロビンのスプライシングアクセプターおよびポリA配列からなるハイブリッドプロモーター（C A Gプロモーター）である請求項4記載の細胞。
6. スタッパー配列が、その下流に位置するC r e遺伝子の発現を抑制するように機能する塩基配列を含有してなる請求項4または5記載の細胞。
- 15 7. C r e遺伝子の発現を抑制するように機能する塩基配列として、ポリA配列、または所望の蛋白質をコードする塩基配列とポリA配列を含有してなる請求項6記載の細胞。
8. 所望の蛋白質が薬剤耐性遺伝子産物である請求項7記載の細胞。
- 20 9. 薬剤耐性遺伝子がネオマイシン耐性遺伝子である請求項8記載の細胞。
10. リコンビナーゼC r e遺伝子の5'側または3'側の末端に核移行シグナル配列を有する請求項4～9いずれか記載の細胞。
11. 請求項4～10いずれか記載の細胞に、リコンビナーゼF L Pを導入することによりリコンビナーゼC r eを発現させる方法。
- 25 12. リコンビナーゼF L Pを導入する方法が、アデノウイルスベクターを用いることを特徴とする請求項11記載の方法。
13. リコンビナーゼF L Pの存在下でF L P依存的にリコンビナーゼC r eを発現する細胞を用いることを特徴とする、組換えウイルスベクターの製造方法。
14. 請求項11または12記載の方法および請求項13記載の方法を用いた組

換えアデノウイルスベクターの製造方法。

15. アデノウイルスベクターが、リコンビナーゼ Cre の認識配列、アデノウイルスパッケージング配列およびリコンビナーゼ Cre の認識配列を上流からアデノウイルスゲノム中に順に有することを特徴とする請求項 14 記載の製造方法。

5 16. 酵母由来 FLP をコードする塩基配列において、FLP 蛋白質のアミノ酸をコードするコドン置換することにより、酵母において好適に用いられるコドンの比率がヒトにおいて好適に用いられるコドンの比率に変更されることによる、ヒトを含む動物細胞での FLP タンパク質の翻訳効率が增強された改変塩基配列を有する DNA。

10 17. FLP をコードする塩基配列の 5' 末端領域が Kozak 配列に一致する請求項 16 記載の DNA。

18. 37℃における FLP 蛋白質の翻訳効率が增強されている請求項 16 または 17 記載の DNA。

15 19. FLP のアミノ酸配列中、2 番目がセリン、33 番目がセリン、108 番目がアスパラギン、および 294 番目がプロリンである、請求項 16～18 いずれか記載の DNA。

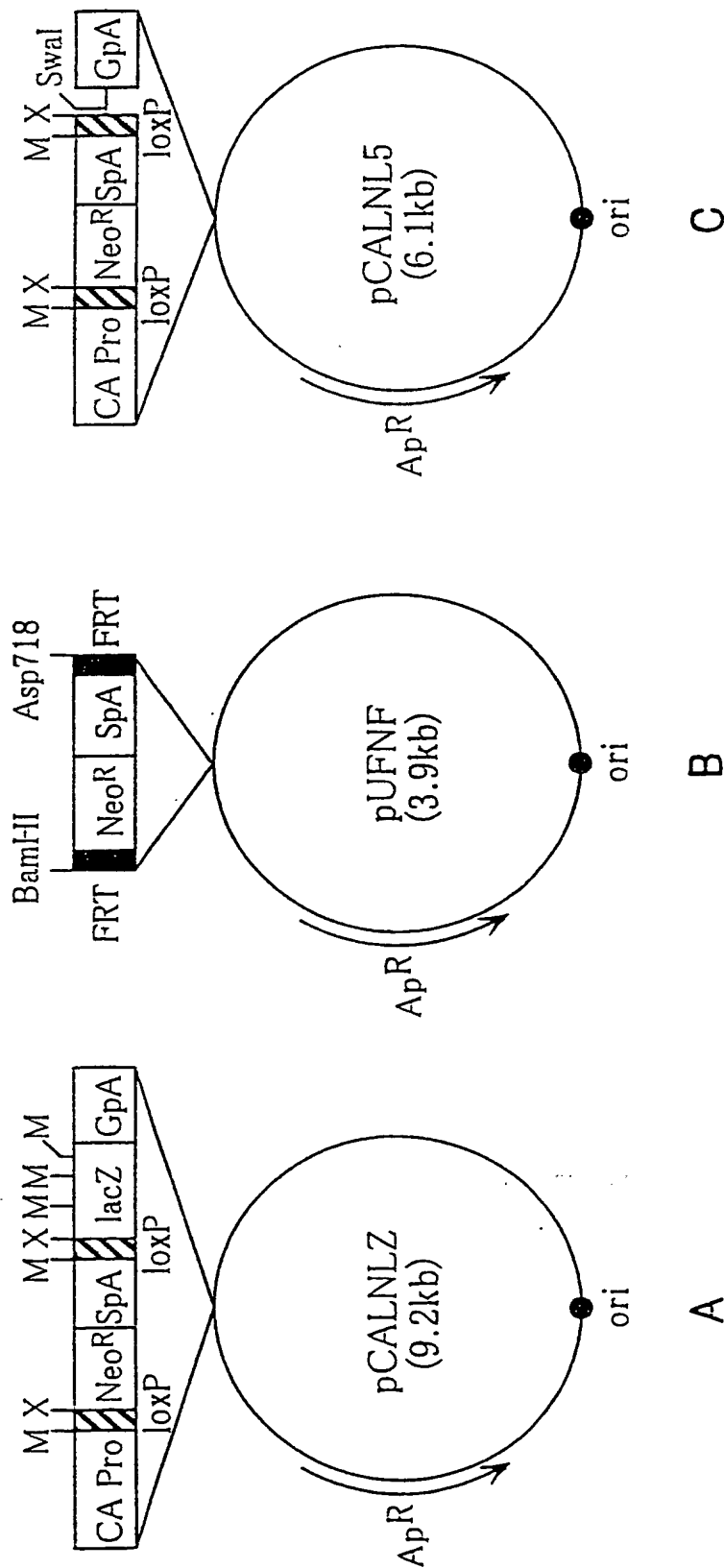
20. 配列番号：5 の塩基配列である請求項 19 記載の DNA。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



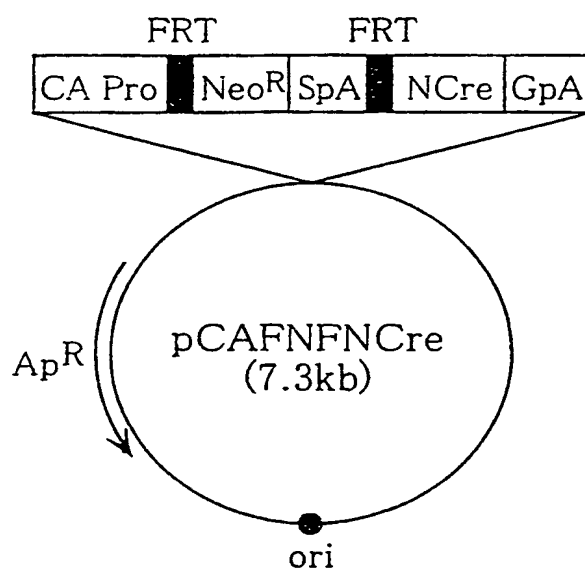
1/4

FIG. 1



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

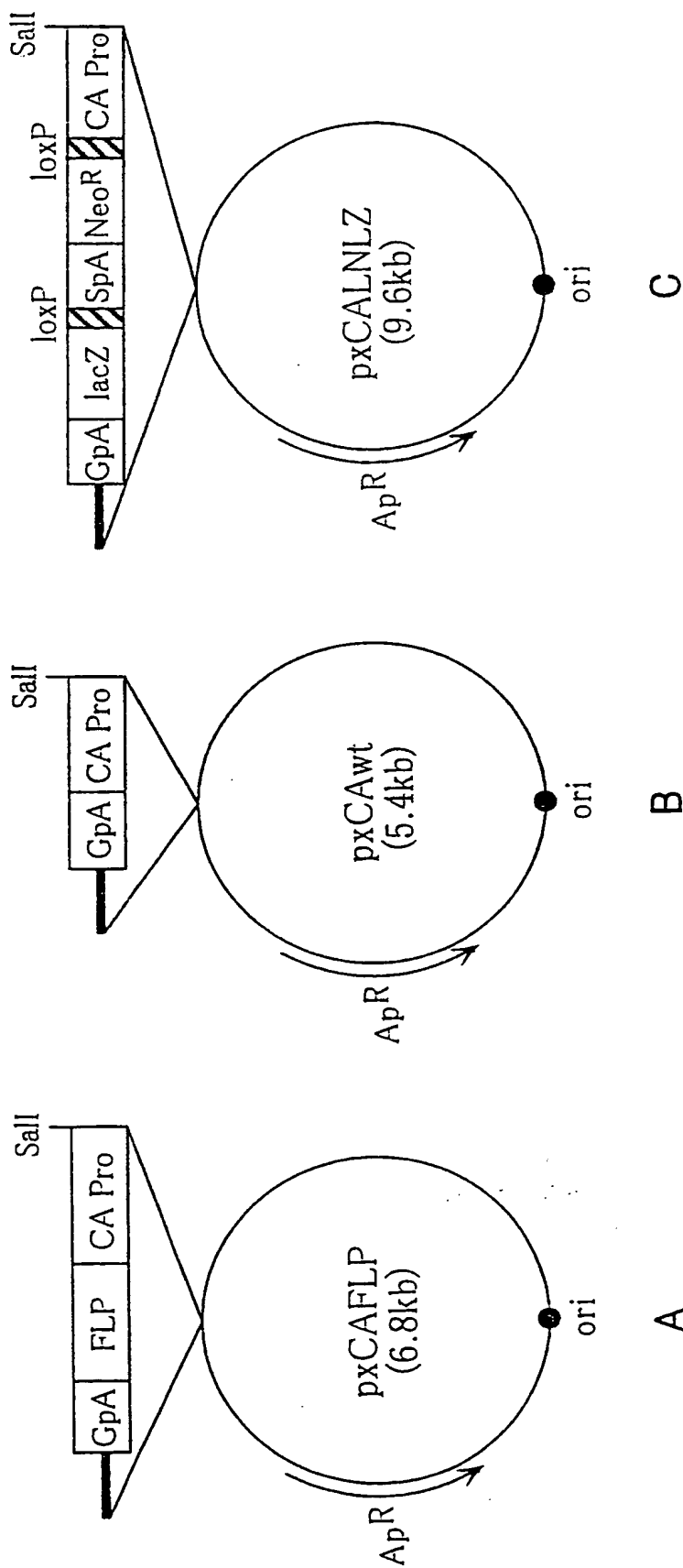
FIG. 2



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3/4

FIG. 3



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4/4

## FIG.4

## ヒト型FLPの塩基配列

-13 cagaccgtgcatc

1 ATGagcCAGTTTGGcATccTgTGcAAgACACCACCTAAGGTGCTgGTgCGcCAGTTcGTG

61 GAgAGGTTTGAgAGgCCcTcTGGaGAGAAgATtGCcTccTGTGCaGCTGAgCTgACCTAc

121 cTgTGcTGGATGATcACcCAcAACGGcACAGCcATCAAGAGgGCCACcTTtATGAGCTAc

181 AAcACcATCATtAGCAAcTCcCTGAGcTTCGAcATTGTgAAcAAgTCcCTCCAGTTTAAA

241 TACAAGACcCAGAAgGCcACAATcCTGGAgGCCTCccTgAAGAAATTGATTCTCTGCTTGG

301 GAgTTcACcATcATcCCcTACaATGGcCAGAAgCAcCAGTCTGATATCACTGATATTGTg

361 AGcAGTcTGCAAcTcCAGTTCGAgTCcTcTGAAGGcGAcAAGGGcAAcAGCCACAGc

421 AAaAAgATGCTgAAgGCcCTgCTcAGTGAGGGaGAAAGCATCTGGGAGATCACTGAGAAg

481 ATcCTgAAcTCcTTTGAGTAcACTTCcAGATTcACcAAgACcAAgACcTTgTACCAgTTC

541 CTgTTCCTgGCcACcTTCATCAAcTGTGGcAGgTTCAGCGAcATcAAGAAAtGTgGATCCc

601 AAATCcTTTAAAcTgGTCCAgAAcAAGTAcCTGGGAGTgATcATCCAGTGccTgGTGACA

661 GAGACcAAGACctctGTgAGcAGGCACATcTACTTCTTctctGccAGGGGcAGGATTtGAT

721 CCACTgGTgTAccTGGATGAgTTccTGAGGAAcTCTGAgCCAGTgCTgAAgCGgGTgAAc

781 AGGACCGGCAAcTCTTccAGCAAcAAgCAGGAgTACCAgcTgcTcAAgGAcAAcCTgGTg

841 AGgTCcTACAAcAAAGCTTTGAAGAAAAATGCcCCcTAccCAATCTTTGCcATcAAgAAT

901 GGCCcTAAGTCcCAcATTGGcAGACaccTGATGACCTCctTcCTgTCcATGAAGGGCCTg

961 ACaGAGcTGACcAATGTTGTGGGcAAcTGGAGCGATAAGCGgGCcTCTGCCGTGGCCAGa

1021 ACAACcTATACTCAcCAGATcACAGCAATcCCTGATCACTACTTCGCACTgGTgTCTCGG

1081 TACTATGCATATGATCCcATcTCcAAGGAgATGATtGCATTGAAGGATGAGACcAAcCCA

1141 ATTGAGGAGTGGCAGCAcAttGAgCAGCTgAAGGGTAGTGCCgAgGGcAGCATtCGcTAC

1201 CCtGCcTGAATGGGATcAttTCcCAGGAGGTgCTgGACTACCTgTctTCCTACATcAAc

1261 AGACGCATcTgA

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

5 <120> Cells Expressing Recombinase

<130> E4831-00

<150> JP 10-289785

10 <151> 1998-10-12

<160> 4

<210> 1

15 <211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20 <223> FLP recognition sequence

<400> 1

aaattccgga gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttcgacgtc attt

54

25 <210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<220>

<223> Polylinker

<400> 2

5 aaattgaatt cgagctcggt acccggg

27

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

10 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sense Strand of Adaptor

15 <400> 3

agcttctgca gcagaccgtg catcatg

27

<210> 4

<211> 19

20 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Strand of Adaptor

25

<400> 4

atgcacggtc tgctgcaga

19

<210> 5

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

&lt;211&gt; 1285

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

5 &lt;400&gt; 5

	cagaccgtgc atcatgagcc agtttggcat cctgtgcaag acaccaccta aggtgctggt	60
	gcgccagttc gtggagaggt ttgagaggcc ctctggagag aagattgcct cctgtgcagc	120
	tgagctgacc tacctgtgct ggatgatcac ccacaacggc acagccatca agagggccac	180
	ctttatgagc tacaacacca tcattagcaa ctccctgagc ttcgacattg tgaacaagtc	240
10	cctccagttt aaatacaaga ccagaaggc cacaatcctg gaggcctccc tgaagaaatt	300
	gattcctgct tgggagttca ccatcatccc ctacaatggc cagaagcacc agtctgatat	360
	caactgatatt gtgagcagtc tgcaactcca gttcgagtcc tctgaggaag ctgacaaggg	420
	caacagccac agcaagaaga tgctgaaggc cctgctcagt gagggagaaa gcatctggga	480
	gatcactgag aagatcctga actcctttga gtacacttcc agattcacca agaccaagac	540
15	cttgtaccag ttcctgttcc tggccacctt catcaactgt ggcaggttca gcgacatcaa	600
	gaatgtggat cccaaatcct ttaaactggt ccagaacaag tacctgggag tgatcatcca	660
	gtgcctgggtg acagagacca agacctctgt gagcaggcac atctacttct tctctgccag	720
	gggcaggatt gatccactgg tgtacctgga tgagttcctg aggaactctg agccagtgct	780
	gaagcgggtg aacaggaccg gcaactcttc cagcaacaag caggagtacc agctgctcaa	840
20	ggacaacctg gtgaggtcct acaacaaagc tttgaagaaa aatgccccct acccaatcct	900
	tgccatcaag aatggcccta agtcccacat tggcagacac ctgatgacct ccttcctgtc	960
	catgaagggc ctgacagagc tgaccaatgt tgtgggcaac tggagcgata agcgggcctc	1020
	tgccgtggcc agaacaacct atactacca gatcacagca atccctgac actacttcgc	1080
	actggtgtct cggtactatg catatgatcc catctccaag gagatgattg cattgaagga	1140
25	tgagaccaac ccaattgagg agtggcagca cattgagcag ctgaagggtg gtgccgaggg	1200
	cagcattcgc taccctgcct ggaatgggat catttcccag gaggtgctgg actacctgtc	1260
	ttcctacatc aacagacgca tctga	1285

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05548

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00, 7/00, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00, 7/00, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), BIOSIS (DIALOG), WPIDS (STN), DDBJ, EMBL, GeneBank, Genseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 8-84589, A (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY LIMITED), 02 April, 1996 (02.04.96), Claims & EP, 704534, A2 & US, 5817492, A & AU, 9530248, A & CA, 2157063, A	1-15
A	JP, 8-308585, A (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY LIMITED), 26 November, 1996 (26.11.96), Claims & EP, 732405, A1 & US, 5700470, A & AU, 9648031, A & CA, 2171368, A	1-15
A	JP, 10-33175, A (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.), 10 February, 1998 (10.02.98), Claims (Family: none)	1-15
A	SUSAN M. et al., "A modular set of F1p, FRT and lacZ fusion vectors for manipulating genes by site-specific recombination.", gene, Vol. 171, p.197-201 (1996)	16-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
28 December, 1999 (28.12.99)

Date of mailing of the international search report  
11 January, 2000 (11.01.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO**



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/05548

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/00, 7/00, A61K48/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/00, 7/00, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), BIOSIS (DIALOG), WPIDS (STN), DDBJ, EMBL, GeneBank, Genseq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 8-84589, A (住友製薬株式会社), 2. 4月. 1996 (02. 04. 96), 特許請求の範囲等参照, & EP, 704534, A2 & US, 5817492, A & AU, 9530248, A & CA, 2157063, A	1-15
A	JP, 8-308585, A (住友製薬株式会社), 26. 11月. 1996 (26. 11. 96), 特許請求の範囲等参照, & EP, 732405, A1 & US, 5700470, A & AU, 9648031, A & CA, 2171368, A	1-15
A	JP, 10-33175, A (久光製薬株式会社), 10. 2月. 1998 (10. 02. 98), 特許請求の範囲等参照, (ファミリーなし)	1-15
A	SUSAN M. et al., "A modular set of Flp, FRT and lacZ fusion vectors for ma nipulating genes by site-specific recombination.", gene, Vol. 171, p. 197-201 (1996)	16-20

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 12. 99

国際調査報告の発送日

11.01.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子 印

4N

9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**